

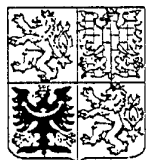
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

279 790

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **3364-91**

(22) Přihlášeno: 07. 11. 91

(30) Právo přednosti:
08. 11. 90 CH 90/03550

(40) Zveřejněno: 13. 05. 92

(47) Uděleno: 25. 04. 95

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 14. 06. 95

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:
C 12 P 17/14
C 12 N 1/21
C 07 D 241/18
C 07 D 241/12

(73) Majitel patentu:
LONZA A.G. Gampel/Wallis (Dir.:Basel),
Basel, CH;

(72) Původce vynálezu:
Kiener Andreas dr., Visp, CH;
Heinzmann Klaus, Visperterminen, CH;
Bokel Michael dr., Visp, CH;

(54) Název vynálezu:
**Mikroorganismus Agrobacterium sp.
DSM6136 a mikrobiologický způsob
výroby hydroxylovaných derivátů
pyrazinu**

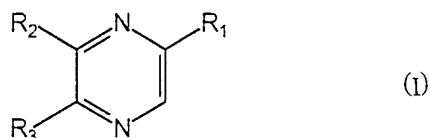
(57) Anotace:
Mikroorganismy Agrobacterium sp. DSM 6136, které jsou schopné růst s pyrazinem jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie. Dále je popsán způsob výroby hydroxylovaných derivátů pyrazinu pomocí mikroorganismů rodu Agrobacterium. Tyto mikroorganismy hydroxylují deriváty pyrazinu obecného vzorce I za vzniku hydroxylovaných derivátů pyrazinu obecného vzorce II. Vzniklé produkty se akumulují v růstovém mediu. Dále je uveden 6-ethyl-2-hydroxypyrazin.

CZ 279 790 B6

Mikroorganismus *Agrobacterium* sp. DSM 6136 a mikrobiologický způsob výroby hydroxylovaných derivátů pyrazinu

Oblast techniky

Vynález se týká nových mikroorganismů, které rostou s pyrazinem a hydroxylují deriváty pyrazinu obecného vzorce I



kde R_1 znamená atom vodíku nebo atom halogenu a R_2 a R_3 jsou shodné nebo rozdílné skupiny a znamenají atom vodíku nebo C_1 - C_4 -alkylovou skupinu, avšak R_1 , R_2 a R_3 neznamenaají současně atom vodíku. Vynález se dále týká způsobu výroby hydroxylovaných derivátů pyrazinu.

Dosavadní stav techniky

Hydroxylované deriváty pyrazinu jsou například důležitými meziprodukty při výrobě methoxyalkylpyrazinů. Methoxyalkylpyraziny jsou základní složkou aromatických látek (Maga a Sizer, J. Agric. Food Chem., 21, 1973, str. 22 až 30).

Dosud jsou známy pouze chemické způsoby výroby hydroxylovaných pyrazinů, jako například způsob popsáný Karmasem a Spoerrim v J. Amer. Chem. Soc., 74, 1952, str. 1580 až 1584. Podle tohoto způsobu se syntetizuje například 2-hydroxy-5-methylpyrazin, vychází se z methylglyoxalu a glycinamidhydrochloridu. Nevýhodou tohoto způsobu je však to, že je produkt silně znečištěn.

Dále jsou popsány výzkumy, které se týkají biologického odbourání 2-hydroxypyrazinu v Matley a Harle, Biochem. Soc. Trans, 4, 1976, str. 492 až 493.

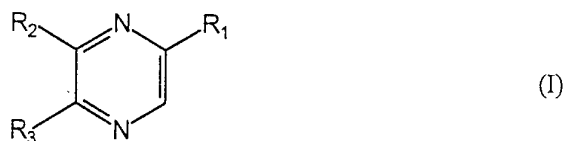
Není znám biotechnologický způsob výroby polohově specificky hydroxylovaných derivátů pyrazinů, kdy se vychází ze substituovaných derivátů pyrazinu a mikroorganismů, které rostou s pyrazinem.

Podstata vynálezu

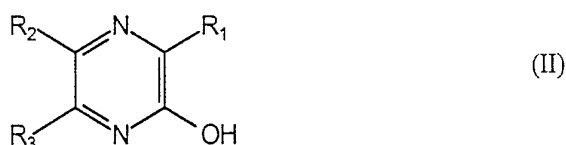
Úlohou předloženého vynálezu je nalézt nové mikroorganismy, které ekonomicky a jednoduše polohově specificky hydroxylují deriváty pyrazinu biotechnologickým způsobem, přičemž deriváty pyrazinu jsou představovány obecným vzorcem I. Další úlohou vynálezu je nalézt biotechnologický způsob výroby hydroxylovaných derivátů pyrazinu.

Úloha je řešena pomocí mikroorganismů podle patentového nároku 1 a pomocí způsobu výroby hydroxylovaných derivátů pyrazi-

nu podle patentového nároku 3. Tyto mikroorganismy jsou schopné růst s pyrazinem jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie. Tyto mikroorganismy přeměňují jako substrát deriváty pyrazinu obecného vzorce I



kde R_1 znamená atom vodíku nebo atom halogenu a R_2 a R_3 jsou shodné nebo rozdílné skupiny a znamenají atom vodíku nebo C_1 - C_4 -alkylovou skupinu, avšak R_1 , R_2 a R_3 neznamenaají současně atom vodíku, na hydroxylovaný derivát pyrazinu obecného vzorce II



kde R_1 , R_2 a R_3 mají shora uvedený význam, přičemž se vzniklé sloučeniny akumulují v růstovém médiu.

Podle vynálezu přicházejí v úvahu všechny mikroorganismy, které využívají pyrazin jako jediný zdroj uhlíku, dusíku a energie a které se běžnými mikrobiologickými technikami oddělují například z prsti, půdních vzorků, čisticích zařízení, mravenišť a kompostů.

Vhodně lze použít všechny gram-positivní a gram-negativní mikroorganismy, které odbourávají pyrazin a které hydroxylují jako substrát derivát pyrazinu obecného vzorce I za vzniku hydroxylovaného derivátu pyrazinu obecného vzorce II a ten akumulují v růstovém médiu.

Výhodným mikroorganismem je *Agrobacterium radiobacter* DRS 3 s č. DSM 6136, který je dále na základě podrobných identifikačních dat označován jako mikroorganismus *Agrobacterium* sp. č. DSM 6136. Tento mikroorganismus byl uložen 7. 9. 1990 u Německé sbírky mikroorganismů (DSM) a buněčných kultur GmbH, Mascherodeweg 1b, 3300 Braunschweig/NSR.

Vědecký popis *Agrobacterium* sp. (č. DSM 6136)

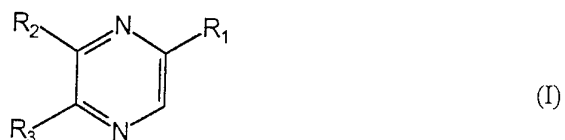
buněčná forma	tyčinky	ADH	-
šířka μm	0,6 až 0,8		
délka μm	1,5 až 3,0	LDC	-
pohyblivost	+	ODC	-
gram-reakce	-	ONPG	+
lyze 3% KOH	+		
aminopeptidáza (Cerny)	+	VP	-
spory	-	indol	-
oxidáza	+	NO_2 z NO_3	+

kataláza	W	dentifikace	+
růst		fenylalanindesa- mináza	-
anaerobní	-		
37/41 °C	-/-	lecitináza	-
pH 5,6	-		
Mac-Conkey-agar	+	ureáza	+
SS-agar	-		
cetrimid-agar	-	Simmon-citrát	-
2% NaCl	-	malonát	-
pigmenty	-		
nedifundující	-	ketolaktóza	-
difundující	-		
fluoreskující	-	hydrolýza	
pyokyanin	-	škrobu	-
		želatiny	-
kyselina z (OF-test)		kaseinu	-
glukózy aerobně	-	DNA	-
glukózy anaerobně	-	tween 80	-
		eskulinu	+
plyn z glukózy	-		
		odbourání tyrosinu	-
kyselina z (ASS)			
glukózy	+	alkalizace	
fruktózy	+	lakmusového mléka	+
xylózy	+		
ethanolu	+	potřeba růstové	-
m-erythritolu	+	látky	
melecitózy	-	využití substrátu	
arabinózy	+	acetát	+
sacharózy	+	adipát	-
celobiózy	+	kaprát	-
trehalózy	+	citrát	-
rhamnózy	+	glykolát	+
dulcitu	-	laktát	+
sorbitu	+	levulinát	-
glycerolu	+	malát	+
malonátu	-		
fenylacetátu	-		
suberátu	-		
sebakinátu	-		
m-tartrátu	-		
L-arabinózy	+		
fruktózy	+		
glukózy	+		
mannózy	+		
maltózy	+		
xylózy	+		
fukózy	-		
mannitu	+		
2-ketoglukonátu	-		
N-acetylglukosaminu	+		
L-asparátu	+		
L-serinu	+		
L-glutamátu	+		
L-histidinu	-		

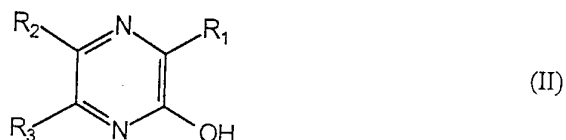
hydroxybutyrátu	-
betainu	+
methylaminu	-
methanolu	-
ethanolu	-

hlavní chinonové složky: ubichinon 10

Při způsobu výroby hydroxylovaných derivátů pyrazinu se pomocí mikroorganismů převede derivát pyrazinu obecného vzorce I



kde R_1 znamená atom vodíku nebo atom halogenu a R_2 a R_3 jsou shodné nebo rozdílné skupiny a znamenají atom vodíku nebo C_1 - C_4 -alkylovou skupinu, avšak R_1 , R_2 a R_3 neznámají současně atom vodíku, na hydroxylovaný derivát pyrazinu obecného vzorce II



kde R_1 , R_2 a R_3 mají shora uvedený význam. Obohacený produkt se izoluje.

Výhodně se pomocí uvedených mikroorganismů vyrábějí hydroxylované deriváty pyrazinu, kde R_1 znamená atom vodíku nebo atom chloru a R_2 a R_3 jsou stejné nebo rozdílné skupiny a znamenají atom vodíku, methylovou skupinu nebo ethylovou skupinu, avšak R_1 , R_2 a R_3 neznámají současně atom vodíku.

Takto se pomocí uvedených mikroorganismů vyrobí nový hydroxylovaný derivát pyrazinu, 6-ethyl-2-hydroxypyrazin.

Obvykle se mikroorganismy před vlastním postupem (reakcí substrátu) kultivují v médiu, které obsahuje růstový substrát.

Růstový substrát pyrazin se používá v množství od 0,001 až 10 % hmot. vztaženo na kultivační médium, výhodně v množství od 0,001 až 5 % hmot. vztaženo na kultivační médium.

Enzymy mikroorganismu, které odpovídají za hydroxylaci, jsou vhodně indukovány pyrazinem.

Sloučenina použitá k indukci může být buď přítomná během reakce derivátu pyrazinu (substrátu), nebo se zamezí přívod této sloučeniny během reakce. Výhodně se zamezí přívod sloučeniny používané k indukci během reakce derivátu pyrazinu buď ukončením přívodu, nebo odstředěním buněk.

Před přidáním substrátu se kultivují buňky až do optické hustoty 100 při 650 nm, výhodně až do optické hustoty od 10 do 60 při 650 nm.

Jako živné médium pro mikroorganismy lze jak pro kultivaci, tak také pro vlastní způsob použití v oboru běžně užívaná média. Výhodně se používá médium, jehož složení je uvedeno v tabulce 1. Vlastní postup potom obvykle probíhá s buňkami v klidu.

Derivát pyrazinu obecného vzorce I se jako substrát může přidávat k buněčné suspenzi jednorázově nebo kontinuálně, s výhodou tak, že koncentrace substrátu v kultivačním médiu nepřesáhne 20 % (hmot./obj.), přičemž zkratka (hmot./obj.) znamená hmotnost na objem. Zvláště výhodně nepřesáhne-li koncentrace substrátu v kultivačním médiu 5 % (hmot./obj.).

Reakce se účelně provádí v rozmezí pH od 4 do 10, výhodně od 6 do 8.

Obvykle se reakce provádí při teplotě od 0 do 55 °C, výhodně při 20 až 40 °C.

Po reakci trvající obvykle 5 až 100 hodin, se izolují hydroxylované deriváty pyrazinu známým způsobem, například extrakcí vhodným organickým rozpouštědlem. Účelně se hydroxylované deriváty pyrazinu izolují extrakcí chlorovanými organickými rozpouštědly, jako jsou například chlorované uhlovodíky nebo ethylacetát.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Izolace mikroorganismů metabolizujících pyrazin

Aerobní mikroorganismy metabolizující pyrazin se koncentrují v A+N-médiu (Tabulka 1) s přidavkem 0,1 % hmot./obj. pyrazinu jako jediného zdroje uhlíku, dusíku a energie. Obecné postupy pro izolaci mikroorganismů jsou například popsány v "G. Drews, Mikrobiologisches Praktikum, 4. vydání, Springer Verlag, 1983".

Jako inokulum se použijí vzorky z prsti, čistících zařízení, kompostu a mravenišť. Koncentráty se pěstují v třepacích baňkách při 30 °C. Po trojnásobném přeočkování do čerstvého média se koncentráty rozetrou na stejné médium s přidavkem 16 g agarů na litr a inkubují se při 30 °C. Po několikanásobném rozetření na agarové médium lze izolovat čisté kultury.

Tabulka 1: A+N-medium

<u>Složení</u>	<u>Koncentrace (mg/l)</u>
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 000
Na_2HPO_4	2 000
KH_2PO_4	1 000
NaCl	3 000
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	400
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	14,5
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,8
pyridoxalhydrochlorid	$10 \cdot 10^{-3}$
riboflavin	$5 \cdot 10^{-3}$
amid kyseliny nikotinové	$5 \cdot 10^{-3}$
thiaminhydrochlorid	$2 \cdot 10^{-3}$
biotin	$2 \cdot 10^{-3}$
kyselina pantothenová	$5 \cdot 10^{-3}$
p-aminobenzoát	$5 \cdot 10^{-3}$
kyselina listová	$2 \cdot 10^{-3}$
vitamín B12	$5 \cdot 10^{-3}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$100 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$90 \cdot 10^{-3}$
H_3BO_3	$300 \cdot 10^{-3}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$200 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$10 \cdot 10^{-3}$
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$20 \cdot 10^{-3}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$30 \cdot 10^{-3}$
$\text{EDTANa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$5 \cdot 10^{-3}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2 \cdot 10^{-3}$

(pH roztoku se nastaví na hodnotu 7,0)

Příklad 2

Přeměna 3-chlorpyrazinu na 3-chlor-2-hydroxypyrazin

Agrobacterium sp. (DSM-č. 6136). v A+N-médiu s 0,1 % hmot./obj. pyrazinem se pěstuje ve fermentátoru při hodnotě pH 7 a při teplotě 30 °C. Potom se buňky odstředí, resuspendují opět v A+N-médiu a nastaví se optická hustota 10 při 650 nm. Tato buněčná suspenze se dá do třepací baňky a smísí se s 26 mmol 3-chlorpyrazinu na litr (0,3 % hmot./obj.). Po inkubaci při 30 °C po dobu 8 hodin na třepacím zařízení se prokáže 20 mmol 3-chlor-2-hydroxypyrazinu na litr, což odpovídá 77 % výtěžku.

Příklady 3 až 5 se provádějí podle příkladu 2 a jsou shrnutě uvedeny v tabulce 2.

Poloha hydroxylové skupiny se určí podle Mac Donalda JC, Bishopa GG, Mazureka (1976), Tetrahedron 32, str. 655a d.a jejich údajů.

Tabulka 2

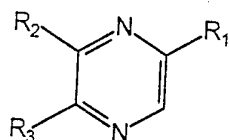
Pří- klad	Substrát	Koncentrace heterocyklu v médiu % (hmot/obj)	Reakční dobu (h)	Konečný produkt	Výtěžek (%)
3	2-methylpyrazin	0,2	1	2-hydroxy-6-methylpyrazin	50
4	2-ethylpyrazin	0,2	24	6-ethyl-2-hydroxypyrazin	20
5	2,3-dimethylpyrazin	0,2	10	2-hydroxy-5,6-dimethylpyrazin	20

Průmyslová využitelnost

Mikroorganismy lze použít všude tam, kde je zapotřebí vyrobit hydroxylované deriváty pyrazinu. Hydroxylované deriváty pyrazinu jsou například důležitými meziprodukty při výrobě methoxyalkylpyrazinů. Methoxyalkylpyraziny jsou základní složkou aromatických látek.

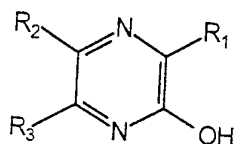
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Mikroorganismus Agrobacterium sp. DSM 6136, který je schopný růst s pyrazinem jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie, a jako substrát přeměňovat deriváty pyrazinu obecného vzorce I



(I)

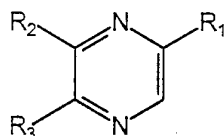
kde R_1 znamená atom vodíku nebo atom halogenu a R_2 a R_3 jsou shodné nebo rozdílné a znamenají atom vodíku nebo C_1 - C_4 -alkylovou skupinu, avšak R_1 , R_2 a R_3 neznamenaají současně atom vodíku, na hydroxylovaný derivát pyrazinu obecného vzorce II



(II)

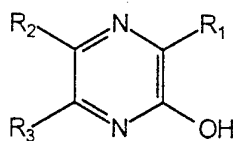
kde R_1 , R_2 a R_3 mají shora uvedený význam, přičemž se vzniklá sloučenina akumuluje v růstovém médiu.

2. Způsob mikrobiologické výroby hydroxylovaných derivátů pyrazinu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se mikroorganismem rodu Agrobacterium, který je schopný růst s pyrazinem jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie, převádí jako substrát derivát pyrazinu obecného vzorce I



(I)

kde R_1 znamená atom vodíku nebo atom halogenu a R_2 a R_3 jsou shodné nebo rozdílné a znamenají atom vodíku nebo C_1 - C_4 -alkylovou skupinu, avšak R_1 , R_2 a R_3 neznamenaají současně atom vodíku, na hydroxylovaný derivát pyrazinu obecného vzorce II



(II)

kde R_1 , R_2 a R_3 mají shora uvedený význam, a že se obohacený produkt izoluje.

3. Způsob podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se reakce provádí pomocí mikroorganismu Agrobacterium sp. uloženého u DSM pod číslem 6136 a/nebo pomocí jeho spontánních mutantů.
4. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 2 nebo 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se účinné hydroxylující enzymy mikroorganismu indukují pyrazinem.
5. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 2 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se reakce provádí při jednorázovém nebo kontinuálním přidání substrátu tak, že koncentrace substrátu v kultivačním mediu nepřesáhne 20 % hmot./objem.
6. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 2 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se reakce provádí při hodnotě pH od 4 do 10.
7. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 2 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se reakce provádí při teplotách od 0 do 55 °C..
8. 6-ethyl-2-hydroxypyrazin.

Konec dokumentu
